

**Protokol ručnog
pročišćavanja priručnik
za uporabu s**

prepIT™•L2P

DNagenotek™

www.dnagenotek.com

Tel.: +1.613.723.5757
support@dnagenotek.com
sales@dnagenotek.com

3000 – 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Kanada K2V 1C2

*Vrhunski uzorci
Dokazana uspješnost*



Protokol prepIT™•L2P dostupan je na dodatnim jezicima na www.dnagenotek.com


Tehnička podrška dostupna je od ponedjeljka do petka (9:00 h do 17:00 h ET):

- Besplatni telefonski broj (Sjeverna Amerika): 1.866.813.6354, opcija 6
- Sve ostale države: +1.613.723.5757, opcija 6
- E-pošta: support@dnagenotek.com

■ DNA Genotek Inc.
3000 – 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Kanada K2V 1C2
E-pošta: support@dnagenotek.com

Odgovorna osoba u UK: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 – UL International,
Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Belgija
E-pošta: EJAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Švicarska
E-pošta: swiss.ar@arazygroup.com

Australski sponsor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,
Sydney, NSW 2000 Australija

Sadržaj

Namjena/svrha	4
Stabilnost tijekom uporabe	4
Značajke	4
Materijali	4
Upozorenja i mjere opreza	4
Ograničenja uporabe proizvoda	5
Prijevoz proizvoda prepIT•L2P	5
Skladištenje proizvoda prepIT•L2P (vijek trajanja)	5
Odlaganje	5
Održavanje/popravci	5
Sažetak karakteristika izvedbe	5
Prezentacije proizvoda	5
Jamstva	6
Rješavanje problema	6
prepIT•L2P laboratorijski protokol za ručno pročišćavanje DNK iz:	
500 µL uzorka	7
Cijeli uzorak	11
Kvantifikacija DNK	18

Namjena/svrha

Za pročišćavanje genomske DNK iz kompleta za prikupljanje sline Oragene™ i ORAcollect™.

Stabilnost tijekom uporabe

PT-L2P-5 (5 mL) i PT-L2P-45 (45 mL) imaju stabilnost tijekom uporabe 30 mjeseci na sobnoj temperaturi.

Značajke

- Optimizirana kemija za maksimalni oporavak DNK iz oralnih uzoraka prikupljenih linijama proizvoda Oragene i ORAcollect.
- Dokazano daje dosljedne rezultate s DNK visoke molekularne težine.
- Skalabilna metoda pročišćavanja za velike ili male količine uzoraka.
- Prikladan tijek rada s potpunom tehničkom podrškom od prikupljanja do ekstrakcije.
- Isplativa metoda koja zahtijeva minimalnu opremu.

Materijali

- PT-L2P-5 (5 mL) i/ili PT-L2P-45 (45 mL)
- Priručnik o proizvodu prepIT•L2P

Upozorenja i mjere opreza

- Samo za uporabu u laboratoriju.
- NEMOJTE gutati tekući reagens.
- NEMOJTE koristiti ako je pakiranje oštećeno ili ako je brtva na poklopcu lijevka slomljena ili propušta.
- NEMOJTE koristiti prepIT•L2 nakon datuma “Uporabljivo do” navedenog na bočici reagensa.
- Iperite vodom ako reagens dođe u dodir s očima ili kožom. NEMOJTE gutati.
- Bilo kakav opasni incident prijavite tvrtki DNA Genetek i odgovarajućoj nadležnoj instituciji u vašoj zemlji.
- Pogledajte sigurnosno-tehnički list (MSDS) za sigurno odlaganje neiskorištenog reagensa.
- Sigurnosno-tehnički list (MSDS) dostupan je na www.dnagenetek.com.

Ograničenja uporabe proizvoda

Koristite prepIT•L2P samo onako kako je navedeno u ovom priručniku.

Prijevoz prepIT•L2P

PrepIT•L2P može se prevoziti na temperaturi okoliša kao laboratorijski reagens. Nije potrebno nikakvo posebno rukovanje.

Skladištenje prepIT•L2P (vijek trajanja)

Čuvajte na sobnoj temperaturi. Rok trajanja za PT-L2P-5 (5mL) i PT-L2P-45 (45 mL) bit će 30 mjeseci ako su pravilno zatvoreni i skladišteni na sobnoj temperaturi.

Odlaganje

Bacite neiskorištene, oštećene komplete ili setove koji propuštaju u skladu s odgovarajućim lokalnim, državnim i saveznim propisima. Bacite kao laboratorijski otpad.

Održavanje/popravci

Nije primjenjivo. PrepIT•L2P je reagens — nije potrebno održavanje niti popravci.

Sažetak karakteristika izvedbe

prepIT•L2P pročišćena genomska DNK iz kompleta za prikupljanje sline Oragene i ORAcollect pruža visoku kvalitetu i kvantitetu DNK dovoljnu za uporabu u nizvodnim primjenama, kao što su PCR, mikronizovi i sekvenciranje sljedeće generacije.

Prezentacije proizvoda

prepIT•L2P dostupan je u više zapremina, ovisno o broju potrebnih pripravaka. Na primjer:

Referenca proizvoda / kataloški broj	Zapremina uzorkovanog preparata	Broj preparata
PT-L2P-5	0,5 mL	200
PT-L2P-45	0,5 mL	2 000

Jamstva

Potpuni uvjeti i odredbe za sve proizvode DNA Genotek nalaze se na <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Rješavanje problema

Kontaktirajte tehničku podršku tvrtke DNA Genotek na support@dnagenotek.com ili nazovite +1 (613) 723-5757, opcija 6.

prepIT™•L2P laboratorijski protokol za ručno pročišćavanje DNK iz 500 µL uzorka

Sljedeći protokol opisuje korak po korak kako pročitati DNK iz alikvota uzorka od 500 µL.

Reagensi uključeni

prepIT•L2P (Kat. br. PT-L2P-5 ili PT-L2P-45)

Oprema i reagensi

- Mikrocentrifuga sposobna za rad pri $15\,000 \times g$
- Mikropruvete od 1,5 mL (npr., Axygen® Kat. br. MCT-150-C)
- Zračni ili vodeni inkubator na 50 °C
- Etanol (95-postotni do 100-postotni) na sobnoj temperaturi
- Etanol (70-postotni) na sobnoj temperaturi
- Međuspremnik za skladištenje DNK: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ili slična otopina

Postupak

Koraci za pročišćavanje	Napomene
1. Pomiješajte uzorak Oragene/ORACollect preokretanjem ili laganim protresanjem u trajanju od nekoliko sekundi.	• Time se osigurava pravilno miješanje viskozni uzoraka.

Koraci za pročišćavanje	Napomene
2. Inkubirajte uzorak na 50 °C u vodenom inkubatoru najmanje 1 sat ili u zračnom inkubatoru najmanje 2 sata.	<ul style="list-style-type: none"> • Ovaj korak toplinske obrade bitan je kako bi se osiguralo da se DNK adekvatno otpusti i da su nukleaze trajno inaktivirane. • Ovaj korak inkubacije može se izvesti u bilo koje vrijeme nakon uzimanja uzorka i prije nego što se pročisti. • Cijeli uzorak mora se inkubirati u originalnoj epruveti za prikupljanje prije dijeljenja alikvota kako bi se osigurala homogenost uzorka. • Uzorak se može inkubirati na 50 °C preko noći ako je tako prikladnije. • Potrebno je duže vrijeme u zračnom inkubatoru jer je temperaturna ravnoteža sporija nego u vodenom inkubatoru. <p>Napomena: Uporaba zračnog inkubatora može biti poželjnija budući da epruvete Oragene/ORACollect mogu plutati u vodenoj kupelji. Ako se mora koristiti vodena kupelj, osigurajte da dio epruvete s uzorkom ostane uronjen u vodu.</p>
3. Prenesite 500 µL miješanog uzorka u epruvetu mikrocentrifuge od 1,5 mL.	<ul style="list-style-type: none"> • Ostatak uzorka može se skladištiti na sobnoj temperaturi (15 °C do 25 °C) ili zamrznuti. • Po želji, uzorak se može pohraniti zamrznut u epruveti Oragene/ORACollect na –20 °C ili se uzorak može prenijeti u kriovijalu za dugotrajno skladištenje na –80 °C.
4. Dodajte 20 µL (1/25 volumena) prepIT-L2P u epruvetu mikrocentrifuge i miješajte tako da se napravi vrtlog u trajanju od nekoliko sekundi.	<ul style="list-style-type: none"> • Uzorak će postati mutan jer se talože nečistoće i inhibitori.
5. Inkubirajte na ledu u trajanju od 10 minuta.	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubacija na sobnoj temperaturi može se zamijeniti, ali će biti nešto manje učinkovita u uklanjanju nečistoća.

Koraci za pročišćavanje	Napomene
6. Centrifugirajte na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta na 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Duži period centrifugiranja (do 15 minuta) može biti koristan za smanjenje zamućenja (visoki A₃₂₀) konačne DNK otopine.
7. Pažljivo prenesite bistri supernatant vrhom pipete u čistu epruvetu mikrocentrifuge. Odbacite pelet koji sadrži nečistoće.	<ul style="list-style-type: none"> • Pelet sadrži mutne nečistoće. Ako se slučajno poremeti, epruvetu treba ponovno centrifugirati.
8. Dodajte 600 µL 95-postotnog do 100-postotnog etanola sobne temperature. Pomiješajte tako da nježno preokrenete epruvetu 10 puta.	<ul style="list-style-type: none"> • Tijekom miješanja s etanolom, DNK će se nataložiti. To se može pojaviti kao ugrušak DNK vlakana ili kao fini talog, ovisno o količini DNK u uzorku. • Čak i ako se ne vidi ugrušak, DNK će se obnoviti pažljivim praćenjem sljedećih koraka.
9. Ostavite uzorak da stoji na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta kako bi se DNK do kraja nataložila.	<ul style="list-style-type: none"> • Ne preporučuje se inkubacija na –20 °C jer se nečistoće mogu pomiješati zajedno s DNK.
10. Postavite epruvetu u mikrocentrifugu u poznatom smjeru. Centrifugirajte na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minute na 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Na primjer, stavite svaku epruvetu u mikrocentrifugu, tako da šarka poklopca bude okrenuta od središta rotora. Nakon centrifugiranja, može se locirati položaj peleta (čak i ako je presitan da bi bio vidljiv). Bit će na vrhu epruvete ispod šarke.
11. Vrhom pipete pažljivo uklonite supernatant i bacite ga. Pazite da izbjegnute ometanje DNK peleta.	<ul style="list-style-type: none"> • Ovaj pelet sadrži DNK. Gubitak peleta dovest će do gubitka DNK. • Okretanje epruvete tako da je pelet na gornjoj stijenci omogućit će vam da sigurno pomaknete vrh pipete duž donje stijenke i uklonite sav supernatant. • Supernatant može sadržavati nečistoće i treba ga ukloniti što je moguće potpunije.

Koraci za pročišćavanje	Napomene
<p>12. Ispiranje etanolom: Pažljivo dodajte 250 µL 70-postotnog etanola. Pustite da odstoji na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minute. Potpuno uklonite etanol bez ometanja peleta.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Važno je da uklonite sav etanol iz uzorka. Prenošenje etanola može utjecati na izvedbu testa. • Nakon uklanjanja 70-postotnog etanola, epruveta se može pulsirajući zavrtjeti kako bi se omogućilo uklanjanje zaostalog etanola. • Pazite da ne uznemirite DNK pelet, može biti malen ili nevidljiv. • U slučaju da se pelet odvoji, centrifugirajte uzorak u trajanju od 5 minuta na 15 000 × g. • Pretjerano sušenje peleta može biti uzrok tomu da se DNK teže otapa.
<p>13. Dodajte 100 µL TE otopine (pogledajte stranicu 5) za otapanje DNK peleta. Vrtite u trajanju od najmanje 5 sekundi.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ako želite višu koncentraciju DNK, potrebno je upotrijebiti 50 µL TE.
<p>14. Da biste osigurali potpunu rehidraciju DNK, inkubirajte na sobnoj temperaturi preko noći nakon čega slijedi miješanje ili na 50 °C tijekom 1 sata uz povremeno miješanje.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Velike količine DNK visoke molekularne težine mogu se sporije rehidrirati (otopiti) u potpunosti. • Nepotpuna rehidracija DNK je uzrok netočnosti u procjeni koncentracije DNK i potencijalnog neuspjeha daljnjih nizvodnih primjena kao što je PCR.
<p>15. Mogućnosti za pohranu potpuno rehidrirane DNK: a) U TE na -20°C za skladištenje tijekom dužeg vremenskog perioda. Ako želite, podijelite na alikvote. b) U TE na 4 °C u trajanju do 2 mjeseca.</p>	

prepIT•L2P laboratorijski protokol za ručno pročišćavanje DNK iz cijelog uzorka

Napomena: Ovaj protokol zahtijeva uporabu centrifuge (bilo fiksnog kuta ili rotora s otkretnom lopaticom) koja može generirati najmanje 3 500 × g za postizanje optimalnih rezultata.

Sljedeći protokol korak po korak opisuje kako pročitati DNK iz cijelog uzorka (1 mL – 4 mL ukupnog volumena uzorka). Prikazani volumeni trebaju biti prilagođeni stvarnom prikupljenom volumenu.

Reagensi uključeni

prepIT•L2P (Kat. br. PT-L2P-5 ili PT-L2P-45)

Oprema i reagensi

- Centrifuga koja prima epruvete od 15 mL i sposobna je generirati najmanje 3 500 × g (pogledajte Tablicu 2)
- Konusne polipropilenske epruvete od 15 mL (npr., BD Falcon® Kat. br. 352196)
- Mikrocentrifuga sposobna za rad pri 15 000 × g (dodatna opcija)
- Mikroeprovete od 1,5 mL (npr., Axygen® Kat. br. MCT-150-C)
- Zračni ili vodeni inkubator na 50 °C
- Etanol (95-postotni do 100-postotni) na sobnoj temperaturi
- Etanol (70-postotni) na sobnoj temperaturi
- Međuspremnik za skladištenje DNK: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ili slična otopina

Dodatno: Provjera prije pročišćavanja (primjenjivo samo za uzorke Oragene, nije obavezno za uzorke ORAcollect)

Izvažite uzorak kako biste procijenili količinu sline koju je dao donor (pogledajte Tablicu 1). Količina sakupljene sline izravno je proporcionalna količini oporavljene DNK. Na primjer, ako je donor dao manje od 2 mL sline, trebali biste očekivati oporavak nižeg ukupnog prinosa iz ovog uzorka.

Težina kompleta (bez uzorka)

Nakon što uzorak stigne u laboratorij, predlažemo da ga izvažete kako biste procijenili je li donor dao odgovarajuću količinu sline. Možete očekivati varijabilnosti između donora. Navedena je težina svakog praznog kompleta (Tablica 1). Za procjenu količine prikupljenog uzorka (pod pretpostavkom 1 g/mL), izvršite sljedeći izračun:


Težina kompleta koji sadrži uzorak – težina kompleta bez uzorka


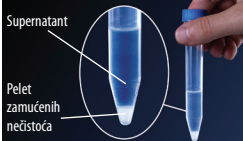
Količina prikupljenog uzorka

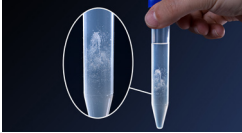
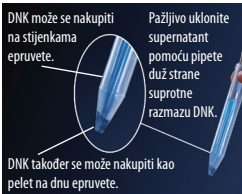
Tablica 1


Proizvod br.	Težina kompleta bez uzorka
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

Postupak

Koraci za pročišćavanje	Napomene
1. Pomiješajte uzorak Oragene/ORAcollect preokretanjem ili laganim protresanjem u trajanju od nekoliko sekundi.	<ul style="list-style-type: none">• Time se osigurava pravilno miješanje viskozni uzoraka.
2. Inkubirajte uzorak na 50 °C u vodenom inkubatoru najmanje 1 sat ili u zračnom inkubatoru najmanje 2 sata.	<ul style="list-style-type: none">• Ovaj korak toplinske obrade bitan je kako bi se osiguralo da se DNK adekvatno otpusti i da su nukleaze trajno inaktivirane.• Uzorak se može inkubirati na 50 °C preko noći ako je tako prikladnije.• Ovaj korak inkubacije može se izvesti u bilo koje vrijeme nakon uzimanja uzorka i prije nego što se pročisti DNK.• Potrebno je duže vrijeme u zračnom inkubatoru jer je temperatura ravnoteža sporija nego u vodenom inkubatoru. <p>Napomena: Uporaba zračnog inkubatora može biti poželjnija budući da epruvete Oragene/ORAcollect mogu plutati u vodenoj kupelji. Ako se mora koristiti vodena kupelj, osigurajte da dio epruvete s uzorkom ostane uronjen u vodu.</p>
3. Premjestite cijeli uzorak u epruvetu centrifuge od 15 mL (Slika 1). Zabilježite zapreminu uzorka.	<ul style="list-style-type: none">• Prijenos se može izvršiti izlivanjem ili pipetiranjem staklenom ili plastičnom pipetom.  <p><i>Slika 1: Prije prelaska na korak 4, provjerite je li cijeli uzorak inkubiran i prebačen u novu epruvetu centrifuge od 15 mL, kao što je prikazano.</i></p>

Koraci za pročišćavanje	Napomene
<p>4. Dodajte 1/25 volumena prepiT-L2P i miješajte okrećući na nekoliko sekundi (Slika 2).</p>  <p><i>Slika 2: Nakon dodavanja PT-L2P i inkubacije na ledu u trajanju od 10 minuta uzorak više neće izgledati bistro nego će umjesto toga biti mutna otopina.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Npr., u 4 mL uzorka dodajte 160 µL prepiT-L2P. Uzorak će postati замуćen jer se talože nečistoće i inhibitori.
<p>5. Inkubirajte na ledu u trajanju od 10 minuta.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inkubacija na sobnoj temperaturi može se zamijeniti, ali će biti nešto manje učinkovita u uklanjanju nečistoća.
<p>6. Centrifugirajte na sobnoj temperaturi na 10 minuta pri najvećoj mogućoj brzini. Najmanje 3 500 × g.</p>  <p><i>Slika 3: Nakon centrifugiranja na dnu epruvete nakupit će se mutni materijal. Supernatant bi trebao biti jasno vidljiv.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Veća centrifugalna sila smanjuje količinu замуćenog materijala koji će se prenijeti u pročišćenu DNK (Slika 3). Prije nego što nastavite, trebali biste provjeriti kod proizvođača epruveta mogu li epruvete za centrifugiranje od 15 mL izdržati centrifugalnu silu. Duži period centrifugiranja (do 20 minuta) može biti koristan za smanjenje замуćenja (visoki A₃₂₀) konačne DNK otopine.
<p>7. Pažljivo prenesite bistri supernatant pipetom u čistu epruvetu mikrocentrifuge zapremnine 15 mL. Bacite pelet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Ostavite malu količinu supernatanta kako biste izbjegli tresenje peleta. Pelet sadrži mutne nečistoće. Ako se slučajno protrese, epruvetu treba ponovno centrifugirati.

Koraci za pročišćavanje	Napomene
<p>8. Dodajte 1,2x zapremine 95-postotnog do 100-postotnog etanola sobne temperature u bistri supernatant. Pomiješajte tako da nježno preokrenete epruvetu 10 puta.</p>  <p><i>Slika 4: Nakon dodavanja etanola DNK će se istaložiti što može rezultirati vidljivim ugruškom vlakana.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Tijekom miješanja s etanolom DNK će se nataložiti. Nataložena DNK može se pojaviti kao ugrušak DNK vlakana (Slika 4) ili kao fini talog, ovisno o količini DNK u uzorku.
<p>9. Ostavite uzorak da stoji na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta kako bi se DNK do kraja nataložila.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Ne preporučuje se inkubacija na -20 °C jer se nečistoće mogu pomiješati zajedno s DNK.
<p>10. Centrifugirajte na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta pri najvećoj mogućoj brzini. Najmanje 3 500 × g.</p>	
<p>11. Pažljivo uklonite supernatant staklenom ili plastičnom pipetom i bacite ga. Pazite da izbjegnute ometanje DNK peleta.</p>  <p><i>Slika 5: Vrhom pipete nježno zagrebite dužinom unutarnje strane epruvete da biste otkrili prisutnost razmaza DNK.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Supernatant može sadržavati nečistoće i treba ga ukloniti što je moguće potpunije. Nataložena DNK naći će se kao pelet na dnu epruvete i možda kao razmaz niz stijenku epruvete (Slika 5). DNK razmaz može se naći na strani epruvete koja je okrenuta od središta centrifuge. Razmaz je moguće locirati koristeći test "grebanjem". Prisutnost razmaza DNK možete provjeriti tako da vrhom pipete zagrebite unutrašnjost epruvete. Kao što se vidi na slici 5, razmaz bi mogao biti vidljiv.

Koraci za pročišćavanje	Napomene
<p>12. Ispiranje etanolom: Pažljivo dodajte 1 mL 70-postotnog etanola u epruvetu bez da dodirnete razmaz ili pelet. Pustite da odstoji na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minute. Nježno vrtite i potpuno uklonite etanol bez dodirivanja peleta i razmaza.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Važno je da uklonite sav etanol iz uzorka. Prenosjenre etanola može utjecati na izvedbu testa. • Pazite da izbjegnute dodirivanje DNK peleta i razmaza. • Može se provesti kratko centrifugiranje (kraće od 1 minute) kako bi se olakšalo potpuno uklanjanje supernatanta. • Ako se talog odvoji nakon koraka ispiranja etanolom, centrifugirajte uzorak u trajanju od 5 minuta na najvećoj mogućoj brzini. Najmanje 3 500 × g.
<p>13. Za uzorke Oragene, rehidrirajte DNK dodavanjem 0,2 mL – 1 mL TE otopine i vrtite uzorak u trajanju od 30 sekundi.</p> <p>Za uzorke ORACollect rehidrirajte DNK dodavanjem 0,2 mL otopine TE i vrtite uzorak u trajanju od 30 sekundi.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ako želite višu koncentraciju DNK, možete smanjiti volumen TE. Potrebno je koristiti najmanje 200 µL TE otopine. • Pretjerano sušenje peleta (> 10 minuta) i upotreba manje od 500 µL TE otopine može otežati rehidraciju (otapanje) DNK i može smanjiti prinos ili otežati kvantifikaciju. • Nataložena DNK naći će se kao pelet na dnu epruvete i možda kao razmaz niz rub epruvete. • Da bi se osigurao maksimalan oporavak DNA, uzorak morate vrtjeti nakon dodavanja DNK otopala (TE otopina). Vrtnja će osigurati da je DNK koja se taloži na stijenici epruvete oporavljena (Slika 6). • Vrtnja neće pokidati DNK.
 <p>Slika 6: Vrtnjom uzorka tijekom 30 sekundi moći ćete prikupiti DNK razmaz na stijenici epruvete. DNK će zadržati visoku molekularnu težinu.</p>	
<p>14. Da biste osigurali potpunu rehidraciju DNK, inkubirajte na sobnoj temperaturi preko noći nakon čega slijedi vrtnja ili na 50 °C tijekom 1 sata uz povremenu vrtanju.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nepotpuna rehidracija DNK uzrok je netočnosti u procjeni koncentracije DNK i potencijalnog neuspjeha daljnjih nizvodnih primjena kao što je PCR.

Koraci za pročišćavanje	Napomene
<p>15. Za čuvanje, premjestite rehidriranu DNK u epruvetu mikrocentrifuge od 1,5 mL.</p>	
<p>Neobavezni korak:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugirajte rehidriranu DNK na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta na 15 000 × g. Prenesite supernatant u čistu epruvetu mikrocentrifuge zapremnine 1,5 mL bez uznemiravanja peleta. 	<p>Imajte na umu da pelet sadrži netopivi, mutni materijal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kako biste maksimalno povećali oporavak DNK, osigurajte da je DNK potpuno rehidrirana (korak 14) prije izvođenja ovog koraka centrifugiranja. • Ovaj korak centrifugiranja osigurava da se sav preostali zamućeni materijal ukloni iz uzorka DNK. • Treba paziti da se ne poremeti talog kada se bistri supernatant prenosi u novu epruvetu.
<p>16. Mogućnosti za pohranu potpuno rehidrirane DNK:</p> <ol style="list-style-type: none"> U TE na –20°C za skladištenje tijekom dužeg vremenskog perioda. Ako želite, podijelite na alikvote. U TE na 4 °C u trajanju do 2 mjeseca. 	<ul style="list-style-type: none"> • Zamrzavanje pročišćene DNK u TE može uzrokovati precipitaciju DNK. Kada odmrzavate zamrznutu pročišćenu DNK, obratite posebnu pozornost na rehidraciju, kao što je objašnjeno u koraku 14.

Kvantifikacija DNK

Metodom fluorescencije

Testovi koji koriste fluorescentne boje su specifičniji od apsorbancije na 260 nm za kvantificiranje količine dvolančane DNK (dsDNA) u uzorku DNK. Predlažemo uporabu komercijalno dostupnih kompleta kao što su komplet za testiranje Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific) ili QuantiFluor® dsDNA System (Promega). DNK će možda trebati razrijediti do 1:50 s TE prije uporabe u testu kvantificiranja.

Metodom apsorbancije

Ako odlučite kvantificirati DNK pomoću apsorbancije, preporučujemo da najprije tretirate pročišćeni uzorak s RNazom kako biste digestirali kontaminirajuću RNK i zatim uklonite fragmente RNK taloženjem DNK u etanolu. Detaljan protokol opisan je u PD-PR-040, *uklanjanje RNK dvostrukom-RNase digestijom*.¹ Imajte na umu da DNK iz oralnog uzorka obično sadrži značajno više RNK nego što se nalazi u uzorcima krvi. Osigurajte da je DNK istaložena alkoholom potpuno otopljena prije očitavanja apsorbancije.

Faktor pretvorbe: Apsorbancija od 1,0 na 260 nm odgovara koncentraciji od 50 ng/μL (50 μg/mL) za čistu, dvolančanu DNK.

Osigurajte da su vrijednosti apsorbancije unutar linearnog raspona spektrofotometra. Razrijedite i ponovno izmjerite uzorke koji su izvan linearnog raspona. Više informacija potražite u dokumentaciji instrumenta.

Reference

- ¹ Uklanjanje RNK pomoću digestije dvostruke RNase. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metoda












1. Razrijedite alikvot od 10 μL pročišćene DNK tretirane RNazom s 90 μL TE (razrjeđivanje 1/10). Nježno promiješajte pipetiranjem gore-dolje. Pričekajte da se mjehurići razbistre.
2. Koristite TE u referentnoj (praznoj) ćeliji.
3. Izmjerite apsorbanciju na 320 nm, 280 nm i 260 nm.
4. Izračunajte ispravljene vrijednosti A_{280} i A_{260} oduzimanjem apsorbancije na 320 nm (A_{320}) od vrijednosti A_{280} i A_{260} .
5. Koncentracija DNK u ng/μL = korigirani $A_{260} \times 10$ (faktor razrjeđenja) \times 50 (faktor pretvorbe).
6. A_{260}/A_{280} omjer: Podijelite korigirani A_{260} po korigiranom A_{280} .

Primjer

1. Pretpostavite izmjereni $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ i $A_{260} = 0,295$
2. DNK koncentracija nerazrjeđenog uzorka bit će:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [faktor razrjeđivanja]} \times 50 \text{ [faktor pretvorbe]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{L ili } 135 \text{ }\mu\text{g/mL}$$
3. Ispravljeni omjer A_{260}/A_{280} bit će:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA i ORAcollect•DNA nisu dostupni za prodaju u Sjedinjenim Američkim Državama. Oragene•DISCOVER je samo za potrebe istraživanja, nije za korištenje u dijagnostičkim postupcima. Neki DNA Genotek proizvodi možda neće biti dostupni u svim zemljopisnim regijama. Oragene, prepIT, ORAcollect i DNA Genotek zaštitni su znakovi tvrtke DNA Genotek Inc. Sve ostale robne marke i nazivi koji se ovdje nalaze vlasništvo su njihovih vlasnika. Svi protokoli tvrtke DNA Genotek, tehnička dokumentacija i napomene o primjeni dostupni su u odjeljku podrške na našoj mrežnoj stranici www.dnagenotek.com.

Oznake na naljepnici:

	In vitro dijagnostički medicinski uređaj
	Kataloški broj
	CE oznaka
	Proizvođač
	Provjerite upute u pakiranju
	Ovlašteni predstavnik u Europi
	Ovlašteni predstavnik u Švicarskoj
	Broj serije
	Jedinstveni broj uređaja
	Stabilnost tijekom uporabe
	Upute za skladištenje
15 °C / 30 °C	
59 °F / 86 °F	

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-29 (HR - Croatia) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., podružnica tvrtke OraSure Technologies, Inc., sva prava pridržana.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com